

Appl. No. 10/655217

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **01163108 A**

(43) Date of publication of application: **27.06.89**

(51) Int. Cl

A01N 63/00
A01N 25/10

(21) Application number: **62321562**

(22) Date of filing: **21.12.87**

(71) Applicant: **KANSAI ELECTRIC POWER CO
INC:THE MITSUBISHI HEAVY IND
LTD**

(72) Inventor: **KITAHARA TSUNEYUKI
HIRANO MASAKI
SUGIMOTO MASAOKI
MINAMIDE YUSHIN
NEGORO MASAOKI
KAMIYOSHI HIDEKI**

**(54) METHOD FOR PREVENTING FOULING WITH
MARINE LIFE**

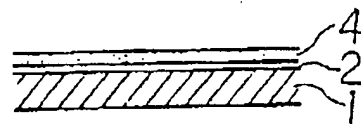
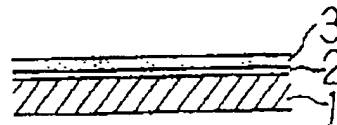
(57) Abstract:

PURPOSE: To effectively prevent the fouling with a marine life, by using a bacteriophage having bacteriolytic activity against fouling microorganism, supporting the bacteriophage on a chitosan-based porous formed material and attaching the material to the expected growing part of said microorganism, thereby efficiently contacting the bacteriophage with the microorganism.

CONSTITUTION: A bacteriophage having bacteriolytic (bacteriocidal) activity against fouling microorganism is supported on a chitosan having a deacetylation degree of preferably 70W90% and a relatively low molecular weight, i.e. about 10,000W300,000. The obtained chitosan-based porous formed material 3, 4 is attached to a structural member 1 of a seawater-utilizing facility on which the adhesion of a marine life is expected. The microorganism existing in seawater flowing in large volume is made to efficiently contact with said bacteriophage maintained at a high concentration on the expected adhesion surface or thereabout. The fouling with adhesive marine life can be effectively and economically controlled by this process without causing

adverse effect on the other microorganisms, animals and plants nor causing secondary pollution such as accumulation in living body.

COPYRIGHT: (C)1989,JPO&Japio



⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平1-163108

⑮ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成1年(1989)6月27日

A 01 N 63/00
25/10

F-7057-4H
7215-4H

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑭ 発明の名称 海洋性生物汚損防止方法

⑰ 特 願 昭62-321562

⑱ 出 願 昭62(1987)12月21日

⑲ 発 明 者 北 原 經 之 大阪府大阪市北区中之島3丁目3番22号 関西電力株式会
社内

⑲ 発 明 者 平 野 正 樹 大阪府大阪市北区中之島3丁目3番22号 関西電力株式会
社内

⑲ 発 明 者 杉 本 正 昭 大阪府大阪市北区中之島3丁目3番22号 関西電力株式会
社内

⑲ 発 明 者 南 出 雄 伸 神奈川県横浜市緑区大場町156番地71号

⑲ 出 願 人 関西電力株式会社 大阪府大阪市北区中之島3丁目3番22号

⑲ 出 願 人 三菱重工業株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番1号

⑲ 代 理 人 弁理士 内 田 明 外 3 名

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

海洋性生物汚損防止方法

2. 特許請求の範囲

海水を利用する施設において、汚損性微生物を溶菌させるバクテリオファージを担持したキトサン系多孔質成形材を、海洋性生物の付着が予測される網漁部材に装着することを特徴とする海洋性生物汚損防止方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は発電所の海水取放水路をはじめ臨海コンビナートにおける海水導入出路の設備機器、船舶および海洋構造物の海水接触区分、海水淡水化装置、冷却塔および噴霧冷水塔などや、定置網などの漁労用網、養殖用漁網などに生ずる海洋性付着生物汚損の防止方法に関する。

〔従来の技術〕

火力発電所や原子力発電所では、復水器冷却用水を主体に冷却水を海洋から多量に取水し冷

却に使用後放流している。この冷却用海水は取水口のバースクリーンによつて粗大異物を除去した後、取水路を経てロータリースクリーンで更に粗大異物並びに海洋生物の生長個体が除かれ、循環水ポンプによつて復水器設備に送られて熱交換に使用された後、放出管路および水路を経て放水口から放流される。

海洋生物は取水口のスクリーンによつて粗大異物と共に生成した個体がある程度は除去できるが、幼生、卵の捕捉は期待できず、これらが付着生育して障害発生の原因となる。すなわち、冷却水の流路である放流水路にはフジツボ、かき、ムラサキガイなどの貝類や藻類などの海洋生物が大量に付着し、この結果、流路抵抗の増加から取水量の低下、付着物の剝離による熱交換器の細管閉塞などの障害をもたらすこととなる。

発電所立地の地域により付着の量には相違があるが、取水路壁に付着する貝類の量は凡そ1kg/設備R・年にも達すると云われており、

その組成の一例を示せば90%程度がムラサキイガイ等のイガイ類で占められ、他は7%前後の藻類と少量のいそぎんちやく、ごかい等の海生生物と土砂で成立っている。

我が国の発電所が臨海立地型である関係上、海洋生物対策は取放水路系や冷却熱交換器などの健全性を保つために重要な課題の一つとなっている。また、上記の問題は発電所冷却水系統設備と同様に海水利用の海洋構造物、船舶の船底区分、定置用漁労網や養殖用網などにおいても障害の原因となっており、大型海生物の付着成長抑制技術の開発が急がれていた。

以上の問題を解決する手段として従来は付着生物の生育を抑制する面と清掃除去の両面から各種の方策が講じられてきた。先ず化学的な生育抑制方法は、塩素注入に代表されるように除害対象生物に対しての毒性成分を注入する方法やトリブチル錫オキシドや銅イオン等の付着忌避成分を海水中の固体表面に塗装などにより装着一して海水中に微量溶出させる方法があげられ

るが、生物汚損に関与しない海洋生物に対しても毒性を及ぼすことや、有用な生体への害殺など、海域の生態系に影響が大きい。また、環境保護面の配慮からその利用は制限されている。また、物理的な処理法として音波、紫外線、温水、高流速などの適用が検討されたが大容量の水に対してこれらの物理的処理条件を付加するためのエネルギー効率の点で実用性に乏しいと云える。更にまた、機械的手段による除去方法については回転ブラシやスクレーパなどの装置化もなされているが材質面と操作上の複雑性と効果など課題が多く残されている。これらの対処方法の現状から、環境を保全してしかも実用性があつて塩素注入ならびに有機錫化合物等の装着一に代替する防汚技術の出現が望まれていた。

近年、バイオテクノロジーに基づく付着生物汚損の防止方法としてバクテリオファージ(以下、単にファージとも云う)を活用する新しい防汚方法が提案されている。この方法は汚損生物の付着生育の過程で細菌を食するファージを介在

させることによりスライム汚損を防止し、引いては付着生物の汚損を防止するもので微生物の増殖作用を利用するユニークな考え方に基く方法である。

このファージによる防汚技術と生物汚損のメカニズムの概要を述べると、先ず海水と接する固体表面に海水中の有機物が付着する。次いで、この有機物被膜に付着細菌が可逆的に次いで不可逆的に付着する。付着した細菌は粘着性の細胞外高分子物質を分泌しスライム状の微生物膜を形成し、次にこの被膜が付着生物の幼生や胞子などを誘引して着生し、それ等が、かき、のり、フジツボ、ムラサキイガイなどのマクロな生物に成長する。この生物汚損発生の過程において付着細菌の着生を防除すれば次段階のマイクロ生物による汚れが防止でき、さらには以後のマクロな生物汚損が防止できるとの考えによるものである。すなわち、この方法は細菌の付着を抑制するために細菌の天敵とも云えるバクテリオファージを利用して食菌作用によつて付着

細菌を除去する方法である。

このファージによる防汚は付着性の細菌と、それに食菌作用をもつファージとが会合接触して宿主となる細菌の細胞内へ遺伝子が注入されることによつてなされる。そこで、通常は 10^8 個/ℓの細菌を含む海水に対してファージを 1ℓ について $10^8 \sim 10^7$ 個が含まれる割合で添加が行われる。両者の会合接触の機会に細菌とバクテリオファージ各々の濃度の積に比例すると云えるのでできる限り添加するファージの濃度を高めることの方策が考慮されている。

〔発明が解決しようとする問題点〕

特定の付着細菌を宿主として、これに特異的に働くファージは次のようなサイクルで殺菌効果を発揮する。すなわち、ファージが特定の細菌(宿主)と会合接触して接合しファージの遺伝子が宿主菌の細胞内へ注入される。注入されたファージの遺伝子により細胞内でファージ遺伝子及び構成蛋白質の複製が行われて新しいファージが形成され、次いで宿主細胞が溶菌さ

れて新しく形成した多数のファージが細胞外に放出される。放出されたファージの形状や性質は元のファージと全く同一であり、再び他の宿主細菌と会合して溶菌し増殖をくり返す。

以上のように生物汚れを起す付着細菌の溶菌作用は、宿主となる細菌とこれに特異的に働くファージとの会合接触によつて初めてなされる。このために会合-接触の機会を増大するべく添加するファージの濃度を高めることが採られてきた。ファージによる防汚法においてファージ培養槽で調整されるファージ溶菌液中のファージ濃度は $10^{11} \sim 10^9$ 個/ml であり充分に高濃度化されていると云える。しかし、その反面、次の問題点を生ずる。すなわち、通常の火力プラント設備の冷却海水量はおよそ $3 \text{ KL} / \text{設備 KW} \cdot \text{日}$ と大量であるためファージ溶菌液と冷却海水の容積比は1容対10万容にもなる。また、塩素注入時のようにインセクターなどにより強制混合すると機械的ショックによりファージの個体を損傷することとなるため、これを避ける

べきことからファージ溶菌液を大量の冷却海水中へ、しかも水路流通の短時間内に均等に分散する操作は容易ではない問題として残されている。

〔発明の目的〕

本発明はバクテリオファージによる海洋性生物の汚損防止に際しての上記技術水準に鑑み、大容量の海水中に存在する汚損性付着細菌と、これに特異的に作用するバクテリオファージとを効率よく会合接触させる方法を提供しようとするものである。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明は海水を利用する施設において、汚損性微生物を溶菌させるバクテリオファージを担持したキトサン系多孔質成形材を、海洋性生物の増生が予測される構造部材に装着することを特徴とする海洋性生物汚損防止方法である。

すなわち、本発明は汚損性付着細菌に対して溶菌活性を有するファージを高濃度に担持する固定化担体としてキトサン系多孔質成形材を選

択したものである。キトサンはキチンを脱アセチル化して得られるポリグルコサミンでセルロースに似た分子構造をもち、分子内に反応性の高いアミノ基を有しているため酵素やファージなどの蛋白質をよく吸着担持する。また、有機酸や鉱酸に易溶性であるため、反応性も高く粒状、膜状、繊維状など種々の形態に成形が可能であるなどの特色を有している。

本発明は、キトサン多孔質成形材に汚損性微生物を溶菌する活性をもつファージを担持させ、海洋性汚損生物の増生が予測される構造部材に装着して海水中の汚損性微生物と効率よく会合接触させて付着生物汚損の防止を効果的に行うものである。

本発明で使用するキトサンの脱アセチル化度および平均分子量は、特に限定するものではないが、脱アセチル化度は70～90%、平均分子量は1万～50万程度の比較的分子量のものをを用いるのが好ましい。なお、脱アセチル化度を上げる程、蛋白質の固定化能力は高くなる

ものである。

〔作用〕

本発明において汚損性微生物を溶菌する活性をもつファージを多量に担持するキトサン系多孔質成形材は、キトサンを醋酸、硝酸などで溶解し、次いで適量のアルカリ性物質を含む塩基性の雰囲気下で球状、フィルム状、繊維状など任意の形状に凝固再生して得られる。また、得られたキトサン系多孔質成形材は必要に応じて架橋処理を行い酸溶解性を調整するなど用途に応じて化学修飾して物性を制御することもできる。

このようにして得られたキトサン系多孔質成形材は分子構造中にアミノ基や水酸基を有しておりバクテリオファージとの親和性が高く、よく固定化することができる。また、キトサン系多孔質成形材は吸着比表面積を $15 \sim 250 \text{ m}^2/\text{g}$ に採れるので単位容積に多量のファージを固定化することが可能である。

海洋性汚損微生物を溶菌し殺菌する活性を有

するフアージを担持させたキトサン系多孔質成形材を汚損性付着微生物の増生が予測される海洋構造部材の海水接触面に塗装などにより装着一して、通常の海水1L中に 10^8 個含まれる細菌中の汚損性付着細菌と上記の担持フアージとの会合接触を行なわさせて溶菌し、殺菌する。

この両者の会合接触は溶菌活性をもつフアージの濃度が高いこと、並びに付着性細菌が増生する部位に装着一されていることから効果的に行われるので、よく汚損性付着細菌を溶菌し殺菌する。また、溶菌作用で宿主細胞外に放出の新しく形成した多数のフアージは形状も性質も全く元の会合接触して宿主細胞に遺伝子を注入したフアージと同一であるため、汚損性微生物を更に溶菌して殺菌する。

また、一般に宿主細菌とフアージとの関係は「1対1」の対応であることが知られており生物汚損に関与する付着細菌のみを特異的に殺菌して防汚するため他の汚損に関与しない微生物や動植物に対して悪影響を及ぼすことがない。

ニから釣菌し、更に培養を繰返してグラム陰性のシュドモナス属桿菌を得た。

他方、同発電所の取水口ロータリスクリーン近傍の海水を採取して上記の桿菌を溶菌するバクテリオファージを溶菌斑形成法により単離した。次いで、このバクテリオファージを増殖してバクテリオファージを 1.41×10^{14} 個/μl含むフアージ水溶液数μlに下記の方法で得たキトサン球状成形体(径 $0.7 \mu m$ 、細孔径 $0.1 \sim 3 \mu m$)を浸漬して25℃にて2時間インキュベイトしたのち分別し、更に無菌保存海水にて繰返し洗滌して 6.36×10^{12} 個/μlキトサン粒状体のフアージを固定したキトサン担持体を調製した。

上記のキトサン球状成形体は脱アセチル化度80%で平均分子量が46000のキトサンを36%酢酸溶液に溶解してキトサン酸性溶液を得、次いでこの溶液を $0.15 \mu m$ 径のノズルから7%苛性ソーダ、30%エタノール、63%水の塩基性溶液中に滴下して粒状に凝固再生させ

しかも自然界に存在するバクテリオファージを用いるため生体蓄積などによる二次公害を起すこともない。

以上の如く、溶菌活性を有するフアージを担持したキトサン系多孔質成形材を海洋性付着汚損の発生する部所に装着一することによつて効果的に、しかも経済的に海洋生物汚損を防止することができる。

〔実施例〕

臨海立地発電所の復水器冷却系統機器の海水接触面から採取した付着細菌と、同発電所の海水取水口近傍の海水から採取した、上記細菌を溶菌する活性をもつバクテリオファージをキトサン成形体に固定化させたバクテリオファージとを接触会合して溶菌反応が生ずることを確認した。

すなわち、復水器の水室壁面からスライムを採取し、このスライムを無菌海水で段階希釈し、次いで酵母エキスを1重量%とポリペプトン0.5重量%を含む寒天培地に生成したコロ

のち、水で中性になるまで充分に洗浄することによつて得られる。

次に寒天二重層培地にて上記の桿菌を培養して宿主菌の培地を作り、これにキトサンのフアージ担持体を播床して、25℃にて10～24時間静置培養した。その結果、宿主である桿菌の増殖により乳白色を呈していた培地面においてキトサンのフアージ担持体播床部の周辺に明確な透明斑を認めた。このことからキトサンのフアージ担持体によつて宿主の桿菌は溶菌されたことが確認できた。このことは、キトサン多孔質材にフアージが充分に固定化されており、これが付着細菌を溶菌浄化することを示している。

次に、第1図(A)、(B)を参照して臨海発電所の取放水路および導水系路の壁面にフアージ担持のキトサン多孔質材を装着一する場合の特色を述べると貝類の付着生物を除去した取放水路壁面および冷却水管路内壁1を高圧水にて洗浄した後、24時間の自然乾燥を経て清掃した壁面に、

エポキシ系またはポリエチレン系などの防食被膜2を行つた上層にフアージを担持したキトサン系多孔質体の微粒($0.3 \mu\text{m} \sim 3 \mu\text{m}$)または短繊維($0.1 \mu\text{m} \sim 1 \mu\text{m}$)を主剤とし、無溶剤タールエポキシ樹脂等を接層剤としたキトサン防汚材料の塗覆3を行いキトサン防汚材面を構成する。(第1図(A))

また、キトサン多孔質材の防食特性を活用してキトサン織布を形成して後、フアージを担持させる処理を経てから水路壁内面に貼附してキトサン防汚材面4を構成することもできる。(第1図(B))

ここで、フアージの担持体として使用するキトサン多孔質材の適性を述べると、その分子構造のうちにアミノ基や水酸基を有していることからフアージを固定化する量は他の固定化材料に比較して大きく、キトサン多孔質材(未架橋、粒径 $0.3 \mu\text{m}$)が 6.18×10^{14} 個/ ml -キトサン粒状体に対して、イオン交換樹脂(例:ダウエックス50W-8X、50~100メッシュ)

が 1.74×10^{14} 個/ ml -イオン交換樹脂であることからフアージの固定化担体として優れていることが判る。

このようにフアージの担持量が多いことから付着性細菌と溶菌活性を有するフアージとの接触会合の機会をフアージ液注入法の場合と比較してみると、フアージ液注入法では 10^8 個/ L の細菌を含む通常の海水に対して1L中に $10^{10} \sim 10^{11}$ 個、好ましくは $10^8 \sim 10^9$ 個のフアージ濃度で添加が行われるが、これに対してキトサンのフアージ固定化物は前述記載の通り 6.18×10^{14} 個/ ml -キトサン粒状体のフアージ濃度であり、フアージ液注入法とは全く比較にならない高濃度で汚損性付着細菌の付着予測面に溶菌活性を有するバクテリオフアージが存在することとなる。

冷却海水に含まれる汚損性の微生物は流速が高い場合(経験より 1 m/s 以上と云われている)には付着性はないが、低流速の場合によく付着することが知られている。冷却海水の流路

壁面における海水流動は微速であり、付着に好適な条件を与えるが、この付着予測面に汚損性細菌を溶菌する活性をもつフアージを高レベルに担持したキトサン多孔質材が装層されているので、効率的に会合接触が行われて溶菌し、浄化の効果が得られる。

また、溶菌作用で宿主細胞外に放出する新しく形成した多数のフアージ(通常、数十~数百個)は形状も性質も全く元のフアージと同一であり、1個のフアージの会合接触によつて数百倍にも濃厚なフアージ濃度の状況を付着予測面近傍に生ずることとなるので、その効果は非常に大きいものとなる。

キトサン多孔質材は、前述の通りセルローズに似た物性を有することから粒状、膜状、繊維状と種々の形態に成形することができるので、付着予測面への粒状あるいは短繊維状キトサン多孔質材の塗覆、および布状あるいは網状としての装層など対象面の条件に合致した対応をすることができる。このことは、流水路壁の海洋

生物付着と同様に、貝や藻類の付着が問題とされる養殖用漁網などに対しても適用性を拡大するものである。

なお、汚損性微生物の種類は単一種ではなく、また季節によつて変化をする。このため、その汚損性微生物のそれぞれに対応して溶菌活性を有するフアージも多数種を必要とするので除害システムとして検出、培養、効果モニターなどを整備して対処することが考えられる。このことからキトサン多孔質材に固定化し担持させるフアージは2種以上の多種類を担持させることもある。

更にまた、キトサン多孔質材は自然界に広く存在する甲殻類や昆虫類などの甲皮に含まれるキチン質から作られているので生体適合性がある。万一、海水中に装層したキトサン多孔質材が外力を受けて不慮に剝離して外海に放出されても、他の魚類や藻類などの生体環境に影響を及ぼすことはない。

更に重ねて、フアージの環境無害性を述べれ

ば、ウイルスの一種であるバクテリオファージは、その名の示す通りバクテリアのみを殺菌する機能をもつものであり、他の生物には全く関与しないことが特性であり、その殺菌（溶菌）の作用も、ファージと細菌は原則的に1対1の対応であることから、溶菌を目標とする汚損性細菌のみに活性を有するファージをキトサン多孔質材に担持すればよい。

このように、ファージを担持したキトサン多孔質材による海洋性付着汚損の防除方法は、生体蓄積に基づく二次公害を発生することなく、環境を保全した汚損防止技術を提供するものである。

〔発明の効果〕

バクテリオファージにより付着性細菌を溶菌（殺菌）して海洋性付着生物汚損を防除する技術は、ファージと付着性細菌とが会合接触することで成立つが、本発明は大容量の流動海水中の付着性細菌が付着の予測面およびその近傍で高レベルに担持されたファージと効率的に会合

するので溶菌され、浄化の効果が得られる。微生物の食菌作用を活用した本発明方法は、自然界の生物活動を利用するものであり実施例の特色に述べた如く数々の特有効果を生ずるので公害を起すことのない新規な海洋性付着生物汚損の防除方法の開発実用化に寄与するものであり、産業上に有益である。

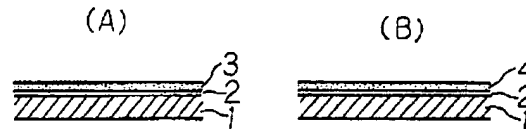
4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の実施例を説明するための図であり、(A)はファージ担持キトサン微粒または短繊維含有防汚材層を、(B)はファージ担持キトサン織布防汚材層を夫々示す。

図において、1は冷却水管内壁、2は防食被覆、3、4はキトサン防汚材料塗膜である。

代理人（弁理士） 内 田 明 一
代理人（弁理士） 萩 原 亮 子
代理人（弁理士） 安 西 篤 子
代理人（弁理士） 平 石 利 子

第1図



第1頁の続き

⑫発明者	根来	正明	兵庫県加古川市上荘町都台2丁目5番20号
⑬発明者	神吉	秀起	兵庫県神戸市垂水区海岸通3番6号